

RECOMBINANT MICROORGANISM EXPRESSING FUSED PROTEIN OF PLAMODIUM OF COLI ANTHROTOXIN II SIGNAL PEPTIDE AND ANTHRO GROWTH HORMONE, AND METHOD FOR PRODUCING ANTHRO GROWTH HORMONE USING THE SAME

Publication number: KR20000019788 (A)

Publication date: 2000-04-15

Inventor(s): KWEON SEI CHANG [KR]; JUNG SUNG YEUP [KR]; SHIN HOON [KR]; CHE JAE DHO [KR]; LEE KWAN SOON [KR]

Applicant(s): HAN MI PHARM IND CO LTD

Classification:

- International:

C12N15/09; C07K14/245; C07K14/61; C07K19/00; C12N1/21; C12N15/31; C12N15/62; C12N15/70; C12P21/02; C12P1/19; C12N15/03; C07K14/195; C07K14/435; C07K19/00; C12N1/21; C12N15/31; C12N15/62; C12N15/70; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/31; C12N15/62

- European:

C07K14/245; C07K14/61; C12N15/62A; C12N15/70

Application number: KR19980038061 19980915

Priority number(s): KR19980038061 19980915

Also published as:

WO0015661 (A1)
US6605697 (B1)
RU2198179 (C2)
NZ510385 (A)
JP2002536765 (T)

more >>

Abstract of KR 20000019788 (A)

PURPOSE: A plasmidium of anthrotoxin II signal peptide and a growth hormone are expressed in the form of a fused protein to produce a natural type growth hormone without using a separate protein expression derivative. **CONSTITUTION:** The plasmidium of anthrotoxin II signal peptide is expressed in E. coli and represented by the formula (I): Met-W-Lys-A-B-Ala-Phe-Leu-Leu-Ala-Ser-E-Phe-Val-Phe-Ser-Ile-Ala-Thr-X-Ala-Y-Ala, wherein W, A, B, E, X and Y are all amino acids genealogically coded by a host cell; and at least one of W and A is Lys. In the formula (I), W is Lys; A is Ser, Thr, Lys or Gln; B is Thr, Ser or Ile; E is Ala, Gly, Val, Leu, Ile or Met; X is Ile, Phe, Asn, Ala or Val; and Y is Gln, Asn, Ala, Lys or Thr.

(19) 대한민국특허청 (KR) (12) 등록특허공보 (B1)

(51) 。 Int. Cl. 6

C12N 15/31

C12N 15/62

(45) 공고일자 2002년08월27일

(11) 등록번호 10 -0316347

(24) 등록일자 2001년11월20일

(21) 출원번호 10 -1998 -0038061

(22) 출원일자 1998년09월15일

(65) 공개번호 특2000 -0019788

(43) 공개일자 2000년04월15일

(73) 특허권자 한미약품(주)
경기 화성군 팔탄면 하저리 893 -5번지

(72) 발명자 권세창
서울특별시 금천구 시흥1동 789 한양아파트 5동 201호
장성업
서울특별시 송파구 거여2동 294 거여아파트 504동 1402호
신훈
서울특별시 양천구 신정동 325 목동아파트 1117동 607호
최재도
서울특별시 강동구 성내3동 동아1차아파트 502호
이관순
서울특별시 송파구 가락2동 극동아파트 2동 806호

(74) 대리인 이한영

심사관 : 임혜준

(54) 대장균엔테로톡신II신호펩티드의변형체와인체성장호르몬의융합단백질을발현하는재조합미생물및그를이용한인체성장호르몬의제조방법

요약

본 발명은 대장균 세포내에서 발현된 외래단백질의 주변세포질 내로의 분비를 촉진하는 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 재조합 미생물 및 그를 이용한 천연형 인체성장호르몬의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 유전자 조작기술에 의하여 보다 높은 분비효율을 가지도록 개선된 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬을 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 별도의 단백질발현 유도제를 사용하지 않고도 천연형의 인체성장호르몬을 고효율로 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 신호펩티드를 인체성장호르몬을 비롯한 여러가지 유용단백질과 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 생체내에서 발현되는 것과 동일한 기능을 가지는 천연형 유용단백질을 고수율로 생산할 수 있을 것이다.

대표도
도 5

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 성숙 인체성장호르몬을 코딩하는 cDNA를 포함하는 재조합 벡터 pT⁻-hGH의 구축과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 엔테로톡신 II 신호펩티드와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pUC19 SH의 구축과정을 나타내는 모식도이다.

도 3은 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인 -달가노 서열 및 엔테로톡신 II 신호펩티드와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 pT14SSH의 구축과정을 나타내는 모식도이다.

도 4는 전기 pT14SSH로부터 유래된 변이주 pT14S1SH -4T22Q의 구축과정을 나타내는 모식도이다.

도 5는 본 발명의 재조합 대장균의 주변세포질로부터 정제된 인체성장호르몬을 SDS -PAGE로 분석한 겔 사진이다

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 분비성 신호펩티드와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 재조합 미생물 및 그를 이용한 인체성장호르몬의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균 세포내에서 발현된 외래단백질의 주변세포질 내로의 분비를 촉진하는 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 재조합 미생물 및 그를 이용한 천연형 인체성장호르몬의 제조방법에 관한 것이다.

최근 들어, 유전자 재조합 기술에 의하여 미생물 숙주로부터 유용단백질을 생산하는 일이 가능케 되었으며, 주된 단백질 생산방법으로는 균체내 생산법과 분비생산법을 들 수 있다.

균체내 생산법은 미생물의 세포질내에서 목적단백질을 발현, 축적하는 방법이며, 단백질 생산량이 높은 것으로 알려져 있다. 그러나, 얻고자 하는 유용단백질이 N -말단에 메티오닌이 부가된 비천형 형태로 발현될 뿐 아니라, 다량 생산시에는 용상 불용성 형태로 얻어지게 되어 단백질 추출과정을 거치면서 천연형과는 다른 고차구조를 형성하기 쉽기 때문에, 단백질의 고차구조를 천연형으로 복원하기 위한 리폴딩 공정이 필요하다는 단점이 있다.

한편, 분비생산법에서는 유용단백질이 N -말단에 분비성 신호펩티드가 부가된 융합단백질로서 발현되는데, 융합단백질이 세포질막을 통과하면서 신호펩티드는 대장균 효소에 의하여 제거되고 유용단백질만이 분비되기 때문에, 유용단백질을 천연 형태로 얻을 수 있다는 장점이 있다. 그러나, 분비생산법은 막통과 및 프로세스의 과정을 거치기 때문에, 균체내 생산법에 비하여 단백질 생산량이 낮다는 단점을 가지고 있다. 특히, 포유류 유래의 단백질을 원핵생물 숙주로부터 분비생산하면, 원핵생물 유래의 단백질을 분비생산하는 경우에 비하여 단백질 생산효율이 상당히 저하되는 것으로 알려져 있기 때문에, 보다 향상된 분비생산법을 개발하고자 하는 연구가 계속되어 왔다.

이와 관련하여, 최근 미생물의 단백질 분비에 관여하는 여러 인자들이 알려지면서, 이들을 이용하여 분비생산법을 개선하고자 하는 노력이 이루어지고 있으며, 그 일례로서 분비성 신호펩티드에 대한 연구를 들 수 있다. 분비성 신호펩티드

는 단백질의 분비과정 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 정상적인 단백질 분비가 이루어지기 위해서는 융합단백질이 세포질막을 통과하는 과정에서 단백질 프로세싱에 의한 신호펩티드의 정확한 절단이 요구된다(참조: J. Biol. Chem., 263:8164 (1990)). 신호펩티드는 크게 '친수형 신호펩티드'와 '소수형 신호펩티드'의 두가지 상이한 유형으로 구별될 수 있는데, 통상적으로 친수형 신호펩티드는 약 12개 내지 70개의 아미노산으로 구성되어 있는 반면, 소수형 신호펩티드는 약 13개 내지 30개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또한, 개개의 소수형 신호펩티드는 보통 세개의 구조적인 성분 즉, 하나 또는 두개의 염기성 아미노산으로 이루어진 비교적 친수성인 N-말단부위, 10개 내외의 소수성 아미노산으로 이루어진 중간부위 및 비교적 측쇄가 작은 아미노산으로 종결되는 비교적 친수성인 C-말단부위로 이루어져 있다.

대장균 내에서 발견되는 분비형의 외래단백질은 일반적으로 내막을 통하여 주변세포질 공간(periplasmic space)으로 수송됨으로써 분비되며, 극히 일부의 분비단백질만이 직접 배지로 분비되는 것으로 알려져 있다. 대장균 내에서 신호펩티드와 결합된 형태로 발견된 일부 외래단백질은 발현직후 대장균의 단백질 분해효소에 의하여 급속히 분해되는 경우도 있으며, 이러한 불안정성은 발현된 단백질이 주변세포질 공간으로 신속히 분비될 수 있도록 신호펩티드를 조작함으로써 예방될 수 있다.

한편, 인체성장호르몬은 총 191개의 아미노산 잔기로 구성된 분자량 약 21,500Da의 단백질 호르몬으로서, 인간 뇌하수체에서 추출 정제된 이래 많은 연구가 진행되어 왔다(참조: Li and Papkoff, Science, 124:1293 (1956)). 베크(Beck) 등은 인체성장호르몬의 사람에게 대한 대사효과 등을 최초로 연구하였고(참조: Beck, J. C., et al., Science, 125:884 (1957)), 라벤(Raben)은 임상시험을 통하여 인체성장호르몬이 뇌하수체성 왜소증 치료에 효과가 있음을 밝힌 바 있다(참조: Raben, M. S., J. Clin. Endocrinol., 18:901 (1958)).

초기에는 성장호르몬 결핍환자를 대상으로 하는 임상시험 및 치료를 위하여, 사람의 뇌하수체에서 직접 추출 정제한 성장호르몬을 사용하였으나, 그 양이 극히 제한되어 있어 많은 어려움이 있었다. 1979년 괴델(Goeddel) 등이 최초로 유전자 재조합 방법으로 대장균에서 인체성장호르몬을 발현시키는데 성공하면서 대량생산의 길이 열리게 되었다(참조: Goeddel, D. V., et al., Nature, 281:544 (1979)). 전기 인체성장호르몬은 천연 호르몬에 비하여 N-말단에 메티오닌이 하나 더 부가된 비천연형 단백질이기 때문에, 인체에 투여시 항체생성물의 증가와 같은 부작용이 예상되었다.

따라서, 천연형 인체성장호르몬을 생산하고자 하는 노력이 계속되어, 재조합 대장균으로부터 세포외 발현에 의하여 천연형 인체성장호르몬을 제조하는 방법이 소개된 바 있으나, 단백질 발현량이 적다는 단점이 있었다(참조: EP 005594 2; EP 0020147; EP 0114695). 또한, 대장균에서 인체성장호르몬을 알칼리 포스파타제 또는 엔테로톡신 단백질의 신호펩티드와 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 발현된 호르몬 단백질을 대장균의 주변세포질 공간으로 분비하도록 하는 방법이 시도되었으나, 이 방법 역시 생산효율이 낮을 뿐만 아니라, 생산량을 증가시키기 위해서는 반드시 IPTG 등의 단백질 발현 유도제가 필요하므로, 생산단가가 높고 추가적인 발효공정이 필요하다는 단점이 있다(참조: 일본국 특허출원 6 - 296491; EP 177,343). 한편, 근제내 생산법으로 메티오닌이 부가된 형태로 인체성장호르몬을 발현한 다음, 추출된 호르몬 단백질로부터 디펩티딜 아미노펩티데이즈 I을 처리하여 메티오닌만을 제거하는 방법이 개발되었으나, 이 방법은 메티오닌을 제거하기 위한 별도의 공정이 더 추가되는 단점이 있다(참조: PCT/DK 86/00014). 이외에, 재조합 효모로부터 천연형 인체성장호르몬을 분비생산하는 방법도 보고된 바 있으나, 원치않는 당쇄화가 일어날 가능성이 있었다.

이와 같이, 생물학적 활성을 가지는 천연형 인체성장호르몬의 효율적 대량생산이 아직까지 이루어지지 못하고 있음에도 불구하고, 최근들어 인체성장호르몬은 뇌하수체성 호소증 치료 이외에도, 터너 증후군 (Turner's syndrome)의 치료에도 사용되고 있으며, 골다공증, 상정 및 화상 등의 치료효과에 대해서도 임상시험이 활발히 진행되는 등 그 적용증이 크게 확대될 것으로 기대되기 때문에, 보다 효율적인 천연형 인체성장호르몬의 생산방법이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 생체내에서 생성되는 것과 동일한 생물학적 기능을 가지는 유용단백질을 고수율로 생산할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 대장균 세포내에서 발현된 외래단백질의 주변세포질 내로의 분비를 촉진할 수 있도록 개선된 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 열고자 하는 유용단백질을 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 재조합 대장균으로부터 인체성장호르몬 등의 유용단백질을 천연형태로 고수율로 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 첫번째 목적은 단백질 분비효율이 개선된 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체를 제공하는 것이다.

본 발명의 두번째 목적은 전기 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

본 발명의 세번째 목적은 전기 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자 및 변이된 대장균 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 네번째 목적은 전기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 대장균을 제공하는 것이다.

본 발명의 다섯번째 목적은 전기 재조합 대장균을 이용한 인체성장호르몬의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명자들은 인체성장호르몬 아미노 말단의 8개 아미노산 서열에 근거하여 합성된 탐침 (probe)을 사용하여, 인간의 뇌하수체 조직의 cDNA 라이브러리로부터 인체성장호르몬 cDNA 전장을 포함하는 클론을 선별하였다. 이어서, 전기 인체성장호르몬 cDNA로부터 신호펩티드 코딩서열을 제거하여 성숙 인체성장호르몬만을 코딩하는 cDNA 절편 ("hGH") 을 수득하는 한편, 내열성 신호펩티드로 알려진 대장균 엔테로톡신 II의 신호펩티드를 코딩하는 유전자 ("STII")를 합성하고, 전기 STII와 hGH를 함께 단백질 발현벡터에 클로닝하여, 엔테로톡신 II의 신호펩티드와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 pTI4SH 벡터를 제조하였다. 그런 다음, 전기 pTI4SH 벡터의 융합단백질 유전자 상위에 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열 ("STII SD")을 삽입하여, 단백질 발현효율이 증가된 pTI4SSH 벡터를 제조하였다. 이어서, 여러가지 합성 올리고뉴클레오타이드들을 프라이머로 사용하는 특정부위치환법으로, 전기 pTI4SSH의 STII 서열 및 STII SD 서열에 변이를 주어, 다양한 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 높은 효율로 발현 분비하는 다양한 변이주들을 제조하였다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명자들은 인체성장호르몬 cDNA를 확보하기 위하여, 먼저 성장호르몬을 분비하는 조직인 인간의 뇌하수체로부터 cDNA 라이브러리를 제조하였다. 전기 cDNA 라이브러리로부터 인체성장호르몬 cDNA 클론을 선별하기 위하여, 공지의 인체성장호르몬 아미노 말단의 8개 아미노산 서열에 기초하여 합성된 혼합서열 올리고뉴클레오타이드 탐침을 이용하여, 플라스미드 혼성화반응 방법으로 인체성장호르몬 cDNA 전장을 포함하는 클론을 선별하였다. 전기 인체성장호르몬 cD

NA 전장에는 신호펩티드 코딩부위가 포함되어 있으므로, 상속 인체성장호르몬의 첫번째 아미노산인 페닐알라닌에 대한 코돈 상류와 종지코돈 하류에 각각 제한효소 인식부위를 가지는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, PCR로 인체성장호르몬 cDNA 전장을 증폭한 다음, 제한효소로 처리하여 신호펩티드 코딩서열이 제거된 인체성장호르몬 cDNA 절편("hGH")을 수득하였다. 이어서, 내열성 신호펩티드로 알려진 대장균 엔테로톡신 II의 신호펩티드를 코딩하는 유전자("STII")를 합성하고, 전기 STII와 hGH를 함께 단백질 발현벡터 pET14b에 클로닝하여, 엔테로톡신 II 신호펩티드의 C-말단 아미노산인 알라닌과 인체성장호르몬의 첫번째 아미노산인 페닐알라닌이 연결된 융합단백질을 발현하는 pT14SH 벡터를 제조하였다. 그런 다음, 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열("STII SD")을 포함하는 프라이머를 사용하여, 전기 pT14SH를 주형으로 하여 PCR을 수행함으로써, STII SD 및 STII-hGH 서열을 포함하는 유전자 절편을 증폭하고, 이를 전기 pET14b 벡터에 클로닝하여, 융합단백질 유전자 상류에 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열이 삽입된 pT14SSH 벡터를 제조하였다. 더 나아가, 발현된 단백질의 주변세포질 내로의 분비효율을 향상시키고자, 여러가지 합성 올리고뉴클레오타이드들을 프라이머로 사용하여 특정부위치환법으로, 전기 pT14SSH의 STII 서열 및 STII SD 서열에 변이를 주어, 다양한 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 효율적으로 발현 분비하는 제조법 변이주들을 제조하였다.

전술한 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 및 그 변형체의 아미노산 서열은 각각 다음과 같다:

야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Met -Lys -Lys -Asn -Ile -Ala -Phe -Leu -Leu -Ala -Ser -Met -Phe -Val -Phe -Ser -Ile

18 19 20 21 22 23

-Ala -Thr -Asn -Ala -Tyr -Ala

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Met -W -Lys -A -B -Ala -Phe -Leu -Leu -Ala -Ser -E -Phe -Val -Phe -Ser -Ile

18 19 20 21 22 23

-Ala -Thr -X -Ala -Y -Ala

상기에서,

W, A, B, E, X 및 Y는 숙주세포가 유전학적으로 암호화할 수 있는 모든 아미노산이며, W와 A 중의 적어도 하나는 Lys이다.

또한, 상기에서 A는 Ser, Thr, Lys 또는 Gln이 보다 바람직하며; B는 W가 Lys 이외의 아미노산인 경우에는 Ser, Thr, Asn, Gln 또는 Arg이 보다 바람직하고, W가 Lys인 경우에는 Thr, Ser 또는 Ile이 보다 바람직하며; E는 Ala, Gly, Val, Leu, Ile 또는 Met이 보다 바람직하고; X는 Ile, Phe, Asn, Ala 또는 Val이 보다 바람직하며; Y는 Gln, Asn, Ala, Lys 또는 Tyr이 보다 바람직하다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 하기 표 1과 같은 10가지 변형체를 제조하였다:

[표 1]

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 여러가지 변형체

	W	A	B	E	X	Y
MST1	Lys	Thr	Ile	Met	Asn	Gln
MST2	Lys	Thr	Ile	Met	Val	Gln
MST3	Lys	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
MST4	Lys	Ser	Ile	Met	Asn	Gln
MST5	Lys	Ser	Ile	Met	Val	Gln
MST6	Lys	Thr	Ile	Gly	Val	Gln
MST7	Lys	Thr	Ile	Leu	Val	Gln
MST8	Lys	Lys	Ser	Met	Asn	Gln
MST9	Val	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
MST10	Val	Lys	Ile	Met	Val	Gln

본 발명의 바람직한 실시예에서는 전기 변형체 폴리펩티드를 코딩하기 위한 유전자 변이를 특정부위치환법으로 생성시켰으나, 이외에도 숙주세포의 코돈편애성을 감안하여 유전자 변이에 사용되는 공지의 방법으로 생성시킬 수도 있다.

한편, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 엔테로톡신 II 신호펩티드 유전자는 화학적으로 합성된 유전자를 사용하였으나, 이외에도 재능으로부터 분리하여 가공된 유전자 또는 유도세포의 mRNA로부터 합성된 cDNA를 사용할 수도 있다. 또한, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체와 융합단백질의 형태로 발현되는 융합단백질로서 인체성장호르몬을 발현하였으나, 발현할 수 있는 융합단백질의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 인체성장호르몬 유전자의 선별

실시예 1-1: 인간 뇌하수체 cDNA 라이브러리의 제조

인체성장호르몬 cDNA를 얻기 위하여, 먼저 인간의 뇌하수체 1g에 조직 구아닌딘 용액(4M 구아닌딘 이소시아나이드, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM EDTA, 5% 2-머캅토에탄올) 10ml를 가하고, 조직균질기로 균질화(homogenization)시켰다. 전기 조직균질액을 6°C에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리시켜 상층액을 회수한 다음, 전기 상층액을 1/10배 부피의 2% 에테르사코실을 첨가하고 65°C에서 2분간 가열하였다. 그런 다음, 전기 용액에 세슘클로라이드(CsCl)를 0.1g/ml의 농도로 첨가하고, 이를 9ml의 세슘클로라이드 쿠션용액(5.7M CsCl, 0.1mM EDTA) 상에서 25,000rpm으로 16시간 원심분리하여 RNA를 함유하는 침전물을 수득하였다. 전기 침전물을 4°C에서 5mM EDTA, 0.5% 사코실 및 5% 머캅토에탄올을 함유하는 수용액 3ml에 용해시키고, 페놀/클로로포름/이소아밀알코올(25:24:1, v/v/v)과 클로로포름/이소아밀알코올(24:1, v/v)로 순차적으로 추출한 다음, 추출된 용액에 1/10배 부피의 3M 소디움아세테이트와 2.5배 부피의 에탄올을 함께 첨가하고, 원심분리하여 RNA 침전물을 수득하였다. 전기 RNA 침전물을 증류수에 용해시킨 다음, 70°C에서 10분간 가열하고, 리튬클로라이드(LiCl)를 최종농도가 0.5M가 되도록 가한 다음, 올리고-디-셀룰로오스 크로마토그래피(Type 3, Collaborative Research, USA)를 이용하여 폴리(A) RNA만을 분리하였다(참조: Aviv, H and Leder P., J. Mol. Biol., 134:743(1972)). 전기 폴리(A) RNA를 65°C에서 5분간 열처리하고, 즉시 0°C에서 20μl의 5mM dNTPs, 40μl의 5 X 역전사효소 완충용액(0.25M Tris-HCl, pH 8.3, 0.5M KCl, 50mM MgCl₂), 10μl의 200mM DTT, 20μl의 0.5mg/ml 올리고(dT₁₂₋₁₈) (Pharmacia Inc., Sweden), 80μl의 열균수, 10μl(10units)의 RNasin(Promega, USA) 및 20μl(20units)의 AMV 역전사효소(Life Science Inc., USA)를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 42°C에서 90분간 반응시켰다. 반응이 완료되었을 때, 5μl의 0.5M EDTA(pH 8.0)와 200μl의 완충액(Tris-buffered phenol)을 첨가하고 잘 교반시켜준 다음, 상온에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 전기 상층액으로부터 역전사 반응생성물을 1ml의 디에틸에테르(diethylether) 2회 추출한 다음, 추출된 시료에 20μl의 3M 소디움아세테이트와 1ml의 95% 에탄올을 첨가하여 cDNA를 침전시켰다.

전기로부터 수득한 단일가닥 cDNA로부터 이중나선 cDNA를 합성하기 위하여, 전기 단일가닥 cDNA 침전물에 284 μ l의 증류수를 첨가하여 용해시킨 다음, 40 μ l의 5mM NTPs, 80 μ l의 5 X SS 완충용액, 12 μ l의 5mM β -NAD⁺, 2 μ l의 3000Ci/mmol [α -³²P]dCTP, 4 μ l (4units)의 대장균 DNA 리가아제 및 10 μ l (100units)의 대장균 DNA 중합효소 I을 가하고, 14°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음, 상기와 동일한 방법으로 페놀추출 및 에탄올침전을 실시하여, 이중나선 cDNA 침전물을 수득하였다. 이중나선 cDNA의 말단을 평할말단으로 만들기 위하여, 전기 이중나선 cDNA 침전물을 42 μ l의 증류수에 용해시킨 다음, 5 μ l의 5mM dNTPs, 16 μ l의 5 X TA 완충용액, 1 μ l의 5mM β -NA D⁺, 4 μ l의 RNase A (2 μ g/ml, Biolabs, USA), 4 μ l (4units)의 RNase H, 2 μ l (20units)의 대장균 DNA 리가아제 및 4 μ l (8units)의 T4 DNA 중합효소를 첨가하고, 37°C에서 45분간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음, 상기와 동일한 방법으로 페놀추출 및 에탄올침전을 실시하여 평할말단을 가지는 이중나선 cDNA 침전물을 수득하였다.

cDNA의 EcoR I 부위를 메틸화시킴으로써 EcoRI 부위를 보호하기 위하여, 전기 평할말단을 가지는 이중나선 cDNA 침전물을 25 μ l의 증류수에 용해시킨 다음, 27 μ l의 2 X 메틸화효소 완충용액 (100mM NaCl, 100mM Tris -HCl, pH 8.0, 1mM EDTA), 1 μ l의 50 X SAM 용액 및 10 μ l (10units)의 EcoR I 메틸화효소 (Biolabs, USA)를 첨가하고, 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음, 상기와 동일한 방법으로 페놀추출 및 에탄올침전을 실시하여 cDNA를 침전시켰다. 침전된 cDNA에 EcoRI 링커 (Biolabs, USA)와 T4 DNA 리가아제를 가하고 4°C에서 반응시켜, cDNA에 EcoRI 링커를 연결하였다.

전기 EcoR I 링커가 연결된 cDNA를 EcoRI로 절단하고, 세파로오스 씨엘-4비 (Sephareose CL-4B) 칼럼을 이용하여 잔여 링커를 제거한 다음, EcoRI 링커가 연결된 cDNA의 절편을 λ gt11의 EcoR I 부위에 클로닝하였다. 전기 λ gt11을 λ 인 비트로 패키징 키트 (λ in vitro packaging kit, Amersham Co., USA)를 이용하여 패키징 (packaging)하고, 대장균에 형질전환 (transfection)시켜, 인간 뇌하수체 cDNA 라이브러리를 제조하였다.

실시예 1-2: 인체성장호르몬 cDNA의 선별

전기 실시예 1-1로부터 수득한 cDNA 라이브러리로부터 인체성장호르몬 유전자를 지닌 클론을 선별하기 위하여, 다음과 같은 방법으로 플라크 혼성화반응 (plaque hybridization)을 실시하였다. 먼저, 유전자 합성기로 인체성장호르몬 아미노말단의 8개 아미노산 서열 (N -Phe -Pro -Thr -Ile -Pro -Leu -Ser -Arg -Leu -Phe)을 기초로 하여 (참조: Liu, W. K., et al., Biochem. Biophys. Acta., 93:428 (1964); Li, C. H., et al., J. Amer. Chem. Soc., 88:2050 (1966)), 30 -뉴클레오타이드 길이의 혼합 -서열 올리고뉴클레오타이드 탐침 (mixed sequence oligonucleotide probe)을 합성하였다. 전기 탐침을 이용하여 벤톤 (Benton) 등의 방법에 따라 플라크 혼성화반응을 실시하여 (참조: Benton, W. D. and Davis, W., Science, 196:180 (1977)), 양성 신호를 보이는 클론을 선별하고, 전기 클론에 대하여 상기와 동일한 방법으로 다시 2차, 3차 플라크 혼성화반응을 실시하여, 인체성장호르몬 유전자를 지닌 클론만을 순수하게 선별하였다. 최종적으로 선별된 파아지를 배양하여 DNA를 추출하고 EcoR I으로 절단한 다음, 1% 아가로스 겔로 전기영동하고, 전기 탐침으로 서던블롯팅을 실시하여 (참조: Southern, E. J. Mol. Biol., 98:503 (1975)), 선별된 클론이 인체성장호르몬 cDNA를 포함하고 있음을 확인하였다. 이어서, 전기 클론으로부터 인체성장호르몬 cDNA를 포함하는 EcoRI 절편을 제조하고, 이를 다시 M13mp18 벡터에 클로닝하여 제조할 벡터 M13 -hGH를 제조한 다음, 생거 (Sanger)의 다메커시 방법 (참조: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74:5463 (1977))으로 인체성장호르몬 cDNA의 염기서열을 확인하였다.

실시예 2 인체성장호르몬 cDNA로부터 인소헵티드 코딩서열의 제가: 성숙 인체성장 호르몬 cDNA의 클로닝

인소헵티드를 제외한 성숙 인체성장호르몬만을 코딩하는 cDNA를 클로닝하기 위하여, 먼저 상기 실시예 1-2로부터 수득한 M13 -hGH를 주형으로 하여 DNA 중합효소 연쇄반응 (DNA polymerase chain reaction, "PCR")법으로 인체성장호르몬 cDNA 전장을 증폭하였다. 이때 사용된 프라이머들은 성숙 인체성장호르몬의 첫번째 아미노산인 Phe에 대한 코돈 상류에는 제한효소 NdeI 인식부위인 5' -CATATG -3' 서열을, 종지코돈 하류에는 제한효소 BamHI 인식부위인 5' -GGATCC -3' 서열을 가지도록 합성되었다. 전기 증폭된 유전자를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단하여, 신호

펩티드 코딩서열이 제거된 cDNA 절편(이하, 'hGH'이라 하기로 함)을 수득한 다음, 전기 절편을 pET14b 벡터(Movagen, USA)의 NdeI/BamHI 부위에 삽입하여, 성숙 인체성장호르몬을 발현하는 제조합 벡터 pT-hGH를 제조하였다(참조: 도 1).

실시예 3: 엔테로톡신 II 신호펩티드와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 제조합 벡터의 제조

실시예 3 -1: 엔테로톡신 II 신호펩티드와 성숙 인체성장호르몬의 융합

먼저, 내열성 신호펩티드로 알려진 대장균 엔테로톡신 II 단백질의 신호펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위하여, 엔테로톡신 II 신호펩티드 코딩서열을 포함하는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 유전자 합성기(Model 380B, Applied Biosystems, USA)로 합성한 다음, 이들을 서냉복원시켜 평활말단을 가진 이중가닥의 엔테로톡신 II 신호펩티드 유전자를 제조하였다. 이때, 전기 올리고뉴클레오타이드는 단백질 개시코돈 상류에는 제한효소 NcoI과 상보적인 제한효소 BspHI의 인식부위를, 그리고, 3' -말단부위에는 암호되는 아미노산의 변화없이 코돈만을 변화시켜 제한효소 MluI 인식부위를 갖도록 제작되었다. 이어서, 전기 이중가닥 엔테로톡신 II 신호펩티드 유전자(이하, 'STII'라 하기로 함)를 pUC19 벡터(Biolabs, USA)의 SmaI 인식부위로 삽입하여, STII를 포함하는 제조합 벡터 pUC19ST를 제조하였다(참조: 도 2).

이어서, 엔테로톡신 II 신호펩티드와 성숙 인체성장호르몬을 융합단백질의 형태로 발현시키기 위하여, 전기 실시예 2로부터 수득한 pT-hGH를 주형으로 하여 PCR로 hGH 절편을 증폭하였다. 이때 사용된 프라이머들은 성숙 인체성장호르몬의 첫번째 아미노산인 Phe에 대한 코돈 상류에는 제한효소 MluI 인식부위인 5' -CATATG -3' 서열을, 또한 종지코돈 하류에는 제한효소 BamHI 인식부위인 5' -ACGGCT -3 서열을 가지도록 합성되었다. 전기 증폭된 유전자 절편을 제한효소 MluI과 BamHI으로 절단하고, 상기 pUC19ST 벡터의 MluI/BamHI 부위에 삽입하여, 엔테로톡신 II 신호펩티드와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 코딩하는 유전자("STII-hGH")를 포함하는 제조합 벡터 pUC19SH를 제조하였다(참조:도 2).

실시예 3 -2: 엔테로톡신 II 유전자의 사인-달가노 서열의 클로닝

전기 실시예 3 -1로부터 수득한 pUC19SH를 제한효소 BspHI과 BamHI으로 절단하여 STII-hGH 절편(640bp)을 제조하고, 이를 pET14b(Novagen, USA) 벡터의 NcoI/BamHI 부위에 삽입하여 제조합 벡터 pT14SH를 제조하였다(참조: 도 2). 이어서, 하기의 대장균 엔테로톡신 II 유전자의 사인-달가노 서열("STII SD")을 포함하는, XbaI 인식부위를 가지는 프라이머 I과 BamHI 인식부위를 가지는 프라이머 II를 이용하여, 전기 pT14SH를 주형으로 PCR를 수행함으로써, STII SD 및 STII-hGH 서열을 모두 포함하는 유전자 절편("STII SD-STII-hGH")을 수득하였다:

프라이머 I:

5' -GCCCTAGAGGTTGAGGTGATTTTATGAAAAAGAATA -3'

XbaI

프라이머 II:

5' -GGATGCCACGCCTGATCTCTAGAAAGCCACAGCTGC -3'

BamHI

전기 STII SD -STII -hGH 절편을 제한효소 XbaI과 BamHI으로 절단한 다음, pET14b 벡터의 XbaI/BamHI 부위에 삽입하여, 제조합 발현벡터 pT14SSH를 제조하였다(참조: 도 3). 이어서, 전기 pT14SSH로 대장균 BL21 (DE3) (Stratagene, USA)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM10010'을 제조하였다.

실시예 3 -3: 인체성장호르몬 발현량 측정

엔테로톡신 II 유전자의 사인 달가노 서열이 단백질 발현효율에 미치는 영향을 조사하고자, pT14SSH로 형질전환된 제조합 대장균과 전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH로 형질전환된 제조합 대장균 HM10010을 각각 IPTG로 단백질 발현을 유도하거나 유도하지 않고 LB 배지에서 배양한 다음, 원심분리 또는 여과법으로 세포를 회수하여, 삼투압 쇼크법으로 주변세포질(periplasm) 용액을 제조하였다(참조: Nossal G.N., J. Biol. Chem., 241:3055(1966)). 이때, 전기 주변세포질 용액의 구체적인 제조방법은 다음과 같다: 제조합 대장균의 배양액을 원심분리하여 균체를 침전시키고, 원래 배양액의 1/10 부피의 동장액(20% 슈크로스, 1mM EDTA를 함유한 10mM Tris -Cl 완충액, pH 7.0)에 현탁하였다. 전기 현탁액을 상온에서 30분간 방치한 다음, 다시 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이어서, 회수된 균체를 4℃의 중류수에 재현탁하고, 다시 원심분리하여 주변세포질 분획을 포함하는 상층액을 회수하였다. 이와 같이 제조된 주변세포질 용액 내의 인체성장호르몬의 농도를 인체성장호르몬에 대한 항체를 사용하여 효소면역측정법으로 측정하고(참조: Kato, K. et al., J. Immunol., 116:1554(1976)), 그 측정치로부터 배양배지 1L 당 인체성장호르몬의 분비량을 환산하여 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

인체성장호르몬 발현량(hGH mg/100 O.D.)

		pT14SH		pT14SSH	
IPTG	-	+	-	+	
hGH 분비량	120	100	330	250	

상기 표 2의 결과로부터, STII SD 서열을 삽입한 경우에, 별도의 단백질 발현 유도제를 첨가하지 않아도 제조합 단백질이 높은 효율로 발현됨을 확인하였다.

실시예 4: 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터의 제조

엔테로톡신 II 신호펩티드 내의 특정 아미노산 잔기만을 변형시키고자, 변이된 코돈을 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 T4 DNA 중합효소를 사용하여 유전자를 증폭하는 공지의 특정부위치환법(site-directed mutagenesis)으로, 전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH 플라스미드로부터 하기 표 3의 다양한 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체를 발현하는 변이주들을 제조하였다. 이어서, 공지의 방법에 따라 DNA 염기서열을 결정하여 원하는 변이주가 제조되었는가를 확인하였다.

[표 3]

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 여러가지 변형체

	W	A	B	E	X	Y
MST1	Lys	Thr	Ile	Met	Asn	Gln
MST2	Lys	Thr	Ile	Met	Val	Gln
MST3	Lys	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
MST4	Lys	Ser	Ile	Met	Asn	Gln
MST5	Lys	Ser	Ile	Met	Val	Gln
MST6	Lys	Thr	Ile	Gly	Val	Gln
MST7	Lys	Thr	Ile	Leu	Val	Gln
MST8	Lys	Lys	Ser	Met	Asn	Gln
MST9	Val	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
MST10	Lys	Lys	Ile	Met	Val	Gln

전기 각 변이주들의 구체적인 제조방법은 다음과 같다:

실시예 4 -1: MST1 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH -4T22Q의 제조

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH 플라스미드를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위 치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu

5' -GG -TGT -TTT -ATG -AAA -AAG -ACA -ATC -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -CC -ACA -AAA -TAC -TTT -TTC -TGT -TAG -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 다시 전기 pT14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변형체와 인체 성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4T를 제조하였다(참조: 도 4). 도 4에서, STII -1은 변이된 STII 서열을 나타낸다.

이어서, 전기 pT14SSH -4T를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST1 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4T22Q를 제조하였다(참조: 도 4):

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

그런 다음, 전기 pT14SSH -4T22Q를 주형으로 하고, STII SD 서열(5' -GAGG -3')과 엔테로톡신 II 신호펩티드 유전자의 개시코돈인 ATG 사이에 mRNA의 2차 구조형성을 방지하는 6개 염기를 포함하는 하기의 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인 -달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH -4T22Q를 제조하였다(참조: 도 4):

5' -TCT -AGA -GGT -TGA -GGT -GTT -TTA -TGA -3'

3' -AGA -TCT -CCA -ACT -CCA -CAA -AAT -ACT -5'

이어서, 전기 pT14S1SH -4T22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10011'을 제조하고, 이를 1998년 8월 12일자로 국제기탁기관인 한국중균협회부설 한국미생물보존센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 KCCM -10137로 기탁하였다.

실시예 4 -2: MST2 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH -4T20V22Q의 제조

전기 실시예 4 -1로부터 수득한 pT14SSH -4T를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로, 20번째 아미노산이 Val으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST2 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4T20V22Q를 제조하였다:

Val Phe Ser Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala Phe

5' -GTT -TTT -TCT -ATT -GCT -ACA -GTT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -ACC -ATT -CCC -3'

3' -CAA -AAA -AGA -TAA -CGA -TGT -CAA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -TGG -TAA -GGG -5'

그런 다음, 전기 실시예 4 -1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH -4T20V22Q로부터 엔테로독신 II 유전자 유래의 샤페론 -달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH -4T20V22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH -4T20V22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10012'를 제조하고, 이를 1998년 8월 12일자로 국제기탁기관인 한국중균협회부설 한국미생물보존센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 KCCM -10138로 기탁하였다.

실시예 4 -3: MST3 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH -4K5T22Q의 제조

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Lys Lys Lys Thr Ala Phe Leu

5' -G -AGG -TGT -TTT -ATG -AAA -AAG -AAG -ACA -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -C -TCC -ACA -AAA -TAC -TTT -TTC -TTC -TGT -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 서열 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 전기 pT14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5T를 제조하였다.

이어서, 전기 pT14SSH -4K5T 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST3 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5T22Q를 제조하였다:

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

그런 다음, 전기 실시예 4 -1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH -4K5T22Q로부터 엔테로독신 II 유전자 유래의 샤인 -달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH -4K5T22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH -4K5T22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10013'을 제조하였다.

실시예 4 -4: MST4 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH -4S22Q의 제조

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Ser으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Lys Lys Ser Ile Ala Phe Leu

5' -G -AGG -TGT -TTT -ATG -AAA -AAG -TCT -ATC -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -C -TCC -ACA -AAA -TAC -TTT -TTC -AGA -TAG -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 전기 pET14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Ser으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4S를 제조하였다.

이어서, 전기 pT14SSH -4S를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Ser으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST4 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4S22Q를 제조하였다:

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

그런 다음, 전기 실시예 4 -1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH -4S22Q로부터 엔테로독신 II 유전자 유래의 샤인 -달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH -4S22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH -4S22Q로 대장균 B L21 (DE3)를 형질전환시켜 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10014'를 제조하였다.

실시예 4 -5: MST5 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH -4S20V22Q의 제조

전기 실시예 4 -4로부터 수득한 pT14SSH -4S를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Ser으로, 20번째 아미노산이 Val으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST5 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4S20V22Q를 제조하였다:

Val Phe Ser Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala Phe

5' -GTT -TTT -TCT -ATT -GCT -ACA -GTT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -ACC -ATT -CCC -3'

3' -CAA -AAA -AGA -TAA -CGA -TGT -CAA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -TGG -TAA -GGG -5'

그런 다음, 전기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH-4S20V22Q로부터 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH-4S20V22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH-4S20V22Q로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM10015'를 제조하였다.

실시예 4-6: MST6 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH-4T12G20V22Q의 제조

전기 실시예 4-5로부터 수득한 pT14SSH-4T20V22Q를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로, 12번째 아미노산이 Gly으로, 20번째 아미노산이 Val으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST6 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH-4T12G20V22Q를 제조하였다:

Ile Phe Leu Leu Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ile

5' -GCA -TTT -CTT -CTT -GCA -TCT -GGT -TTC -GTT -TTT -TCT -ATT -GC -3'

3' -CGT -AAA -GAA -GAA -CGT -AGA -CCA -AAG -CAA -AAA -AGA -TAA -CG -5'

그런 다음, 전기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH-4T12G20V22Q로부터 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH-4T12G20V22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH-4T12G20V22Q로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM10016'를 제조하였다.

실시예 4-7: MST7 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14S1SH-4T12L20V22Q의 제조

전기 실시예 4-6으로부터 수득한 pT14SSH-4T12G20V22Q를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Thr으로, 12번째 아미노산이 Leu으로, 20번째 아미노산이 Val으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST7 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH-4T12L20V22Q를 제조하였다:

Ile Phe Leu Leu Ala Ser Leu Phe Val Phe Ser Ile

5' -GCA -TTT -CTT -CTT -GCA -TCT -CTT -TTC -GTT -TTT -TCT -ATT -GC -3'

3' -CGT -AAA -GAA -GAA -CGT -AGA -GAA -AAG -CAA -AAA -AGA -TAA -CG -5'

그런 다음, 전기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 전기 pT14SSH-4T12L20V22Q로부터 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인-달가노 서열이 변이된 새로운 변이주 pT14S1SH-4T12L20V22Q를 제조하였다. 이어서, 전기 pT14S1SH-4T12L20V22Q로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM10017'을 제조하였다.

실시예 4-8: MST8 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH-4K5S22Q의 제조

전기 실시예 3-2로부터 수득한 pT14SSH를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ser으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Lys Lys Lys Ser Ala Phe Leu

5' -G -AGG -TGT -TTT -ATG -AAA -AAG -AAG -TCT -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -C -TCC -ACA -AAA -TAC -TTT -TTC -TTC -AGA -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 전기 pT14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ser으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5S를 제조하였다.

이어서, 전기 pT14SSH -4K5S를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ser으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST8 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5S22Q를 제조하였다:

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

이어서, 전기 pT14SSH -4K5S22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM1001 8'을 제조하였다.

실시예 4 -9: MST9 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -2V4K5T22Q의 제조

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 2번째 아미노산이 Val으로, 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Val Lys Lys Thr Ala Phe Leu

5' -G -ACG -TGT -TTT -ATG -GTT -AAG -AAG -ACA -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -C -TCC -ACA -AAA -TAC -CAA -TTC -TTC -TGT -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 전기 pT14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로독신 II 신호펩티드의 2번째 아미노산이 Val으로, 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -2V4K5T를 제조하였다.

이어서, 전기 pT14SSH -2V4K5T를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로독신 II 신호펩티드의 2번째 아미노산이 Val으로, 4번째 아미노산이 Lys으로, 5번째 아미노산이 Thr으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST9 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -2V4K5T22Q를 제조하였다:

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

이어서, 전기 pT14SSH -2V4K5T22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조합 대장균 'Escherichiacoli HM10019'를 제조하였다.

실시예 4 -10: MST10 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5I20V22Q의 제조

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 pT14SSH를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로 치환된 변이주를 제조하였다:

Met Lys Lys Lys Ile Ala Phe Leu

5' -G -AGG -TGT -TTT -ATG -AAA -AAG -AAG -ATC -GCA -TTT -CTT -C -3'

3' -C -TCC -ACA -AAA -TAC -TTT -TTC -TTC -TAG -CGT -AAA -GAA -G -5'

전기 변이주로부터 STII SD 및 변이된 STII 서열을 포함하는 XbaI -MluI 절편을 제조하고, 이를 전기 pT14SSH 벡터의 XbaI/MluI 부위에 삽입하여, 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K를 제조하였다.

그런 다음, 전기 pT14SSH -4K를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K22Q를 제조하였다:

Asn Ala Gln Ala Phe

5' -CA -AAT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -3'

3' -GT -TTA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -5'

이어서, 전기 pT14SSH -4K22Q를 주형으로 하고, 하기와 같은 염기서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 특정부위치환법으로 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Lys으로, 20번째 아미노산이 Val으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 치환된 MST10 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 변이주 pT14SSH -4K5I20V22Q를 제조하였다:

Val Phe Ser Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala Phe

5' -GTT -TTT -TCT -ATT -GCT -ACA -GTT -GCC -CAA -GCG -TTC -CCA -ACC -ATT -CCC -3'

3' -CAA -AAA -AGA -TAA -CGA -TGT -CAA -CGG -GTT -CGC -AAG -GGT -TGG -TAA -GGG -5'

이어서, 전기 pT14SSH -4K5I20V22Q로 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켜 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10020'을 제조하였다.

실시예 5 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체가 인체성장호르몬의 분비에 미치는 영향

전기 실시예 3 -2로부터 수득한 제조한 대장균 'Escherichiacoli HM10010' 및 실시예 4 -1 내지 4 -10으로부터 수득한 10가지의 제조한 대장균들(즉, 'Escherichiacoli HM10011' 내지 'Escherichiacoli HM10020')을 각각 전기 실시예 3 -3과 동일한 방법으로 배양하고 주변세포질 용액을 제조한 다음, 전기 주변세포질 용액 내의 인체성장호르몬의 농도를 측정하고, 그 측정치로부터 배양액지 1L 당 인체성장호르몬의 분비량을 환산하였다. 그 결과는 하기 표 4와 같다.

[표 4]

인체성장호르몬 발현량 (hGH mg/100 O.D.)

제조합 대장균	발현벡터	hGH 발현량
HM10010	p14SSH	330
HM10011	pT14S1SH -4T22Q	1,350
HM10012	pT14S1SH -4T20V22Q	1,300
HM10013	pT14S1SH -4K5T22Q	1,270
HM10014	pT14S1SH -4S22Q	1,320
HM10015	pT14S1SH -4S20V22Q	1,230
HM10016	pT14S1SH -4T12G20V22Q	1,173
HM10017	pT14S1SH -4T12L20V22Q	1,282
HM10018	pT14SSH -4K5S22Q	1,150
HM10019	pT14SSH -2V4K5T22Q	1,140
HM10020	pT14SSH -4K5I20V22Q	1,230

상기 표 4의 결과로부터, 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체를 이용함으로써, 제조합 대장균에서의 인체성장호르몬의 분비효율을 월등하게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

실시예 6: 제조합 대장균을 이용한 인체성장호르몬의 발현 및 분리 정제

전기 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬 간의 융합단백질을 발현하는 제조합 대장균을 LB 배지에서 배양하면서 IPTG로 단백질 발현을 유도하고, 전기 배양액을 6000rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수한 다음, 전기 실시예 3 -3과 동일한 방법으로 주변세포질 용액을 제조하였다. 전기 주변세포질 용액으로부터 이온교환수지, 흡착 및 겔 여과 칼럼 또는 항체 칼럼 크로마토그래피방법으로 인체성장호르몬을 분리 정제한 다음, SDS -PAGE로 정제된 호르몬의 순도 및 대략적인 농도를 확인한 데 이어, 상기의 효소면역측정법으로 정확한 호르몬의 농도를 측정하였다. 도 5는 전기 실시예 4 -1로부터 수득한 제조합 대장균 *Escherichiacoli* HM10011'의 주변세포질로부터 정제된 인체성장호르몬을 SDS -PAGE로 분석한 겔 사진이다 (레인 1: 단백질 크기 마커; 레인 2: 정제된 인체성장호르몬). 도 5에서 보듯이, 본 발명의 제조합 대장균을 대량배양함으로써 고순도의 천연형 인체성장호르몬을 다량으로 수득할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 분비성 신호펩티드와 인체성장호르몬의 융합단백질을 발현하는 제조합 미생물 및 그를 이용한 인체성장호르몬의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 유전자 조작기술에 의하여 보다 높은 분비효율을 가지도록 개선된 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬을 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 별도의 단백질발현 유도체를 사용하지 않고도 천연형의 인체성장호르몬을 고효율로 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 신호펩티드를 인체성장호르몬을 비롯한 여러가지 유용단백질과 융합단백질의 형태로 발현시킴으로써, 생체내에서 발현되는 것과 동일한 기능을 가지는 천연형 유용단백질을 고순율로 생산할 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 일반식 (I)로 표시되는 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체:

Met -W -Lys -A -B -Ala -Phe -Leu -Leu -Ala -Ser -E -Phe -Val -Phe -Ser -Ile -Ala -Thr -X -Ala -Y -Ala (I)

상기 식에서,

W는 Lys 또는 Val이고;

A는 Ser, Thr, Lys 또는 Gln 이며;

B는 Thr, Ser, Ile, Asn, Gln 또는 Arg이고;

E는 Ala, Gly, Val, Leu, Ile 또는 Met이며;

X는 Ala, Val, Ile, Phe 또는 Asn 이고; 및,

Y는 Gln, Asn, Ala, Lys 또는 Tyr이다.

청구항 2.

제 1항의 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체를 코딩하는 유전자.

청구항 3.

제 1항의 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 변형체와 외래단백질의 융합단백질을 코딩하는 유전자 및 전기 유전자의 단백질 개시코돈 직전에 하기와 같은 변이된 대장균 엔테로톡신 II 유전자 유래의 사인 -달가노 서열을 포함하는 재조합 벡터:

5' -GAGGTGTTTT -3'

청구항 4.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 20번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 5.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 6.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ile에서 Thr으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 7.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Ser으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 8.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Ser으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 9.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 12번째 아미노산이 Met에서 Gly으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 10.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로톡신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 12번째 아미노산이 Met에서 Leu으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 11.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로독신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ile에서 Ser으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 12.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로독신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 2번째 아미노산이 Lys에서 Val으로, 4번째 아미노산이 Asn에서 Lys으로, 5번째 아미노산이 Ile에서 Thr으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 13.

제 3항에 있어서,

대장균 엔테로독신 II 신호펩티드 변형체는 야생형 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Lys으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 변형체이며, 외래단백질은 인체성장호르몬인 것을 특징으로 하는

재조합 벡터.

청구항 14.

야생형 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자 및 전기 유전자의 단백질 개시코돈 직전에 하기와 같은 변이된 대장균 엔테로독신 II 유전자 유래의 사인 -달가노 서열을 포함하는 재조합 벡터 pT14S1SH -4T22Q:

5' -GAGGTGTTTT -3'

청구항 15.

야생형 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 4번째 아미노산이 Asn에서 Thr으로, 20번째 아미노산이 Asn에서 Val으로, 22번째 아미노산이 Tyr에서 Gln으로 치환된 대장균 엔테로독신 II 신호펩티드의 변형체와 인체성장호르몬의 융합단백질을 코딩하는 유전자 및 전기 유전자의 단백질 개시코돈 직전에 하기와 같은 변이된 대장균 엔테로독신 II 유전자 유래의 사인 -달가노 서열을 포함하는 재조합 벡터 pT14S1SH -4T20V22Q:

5' -GAGGTGTTTT -3' .

청구항 16.

제 14항의 재조합 벡터 pT14S1SH -4T22Q로 형질전환된 재조합 대장균 *Escherichiacoli* HM10011 (KCCM -10137).

청구항 17.

제 15항의 재조합 벡터 pT14S1SH-4T20V22Q로 형질전환된 재조합 대장균 *Escherichia coli* HM10012(KCCM -10138).

청구항 18.

제 3항의 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 배양하고, 전기 미생물의 주변세포질(periplasm) 용액으로부터 외래단백질을 수득하는 공정을 포함하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 19.

제 18항에 있어서,

재조합 미생물은 *Escherichia coli* HM10011(KCCM -10137)인 것을

특징으로 하는

재조합 단백질의 제조방법.

청구항 20.

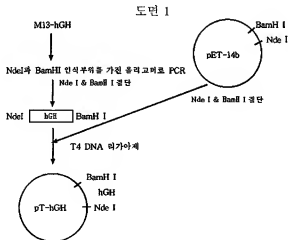
제 18항에 있어서,

재조합 미생물은 *Escherichia coli* HM10012(KCCM -10138)인 것을

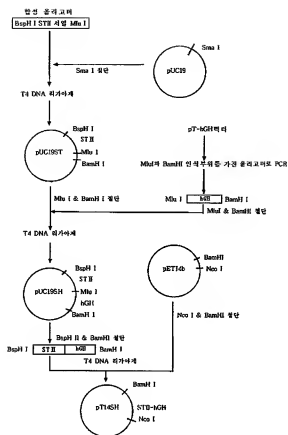
특징으로 하는

재조합 단백질의 제조방법.

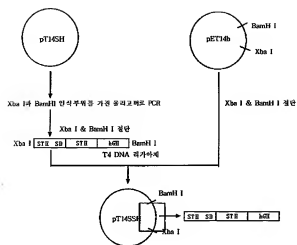
도면



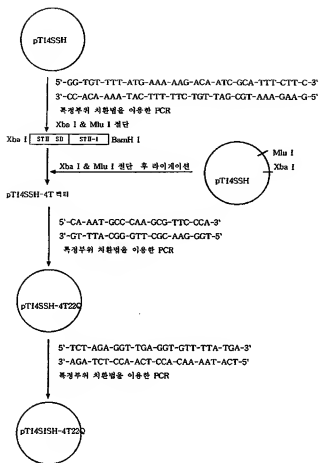
도면 2



도면 3



도면 4



도면 5

